



The role of Rab small GTPases in recycling endosomal compartments

著者	衛藤 貫
号	16
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第372号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126117

	えとう かん
氏名（本籍地）	衛藤 貫
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 372 号
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 , 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	The role of Rab small GTPases in recycling endosomal compartments（リサイクリングエンドソ ームにおける低分子量 G 蛋白質 Rab の役割）
博士論文審査委員	（主査）教授 福田 光則 教授 大橋 一正 教授 田口 友彦

論文内容の要旨

【背景】

オルガネラの一つであるリサイクリングエンドソーム (RE) は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込んだ分子を適切な目的地まで輸送するための選別の場として機能する。近年、この RE が神経突起伸長や繊毛形成などの生理現象に関与することが明らかになってきたが、RE の形成・機能を制御する分子機構は未だ不明な点が多い。

低分子量 G 蛋白質 Rab は、進化的に保存された膜輸送の制御因子である。Rab は活性化型と不活性化型をサイクルする分子スイッチとして働き、活性化型の時に膜輸送を促進する特異的な結合分子 (エフェクター分子) をリクルートすることで機能を発揮すると考えられている。Rab は哺乳類に約 60 種類存在し、各々が RE を含む様々なオルガネラの機能を制御することが知られている。

私は Rab に着目することで、RE 制御の基盤となる分子機構の解明を試みた。本研究では、「(第一部) 神経突起伸長における RE 制御因子 Rab35 の機能解析」と「(第二部) 管状エンドソーム形成機構の解明」を目的に研究を行った。

【神経突起伸長における RE 制御因子 Rab35 の機能解析】

これまでの研究で、Rab35 は複数種のエフェクター分子と結合することで神経突起伸長を制御することが報告されているが、全てのエフェクター分子と同時に結合することはできないため、状況に応じてエフェクター分子を使い分けていると予想される。しかし、各々のエフェクター分子が Rab35 によ

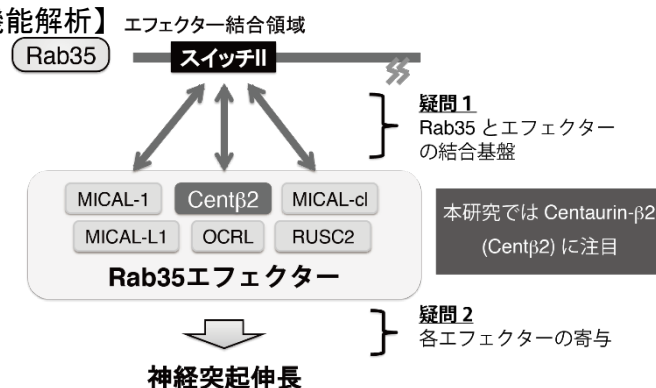


図1 Rab35 の複数種の結合分子と神経突起伸長への関与

りどのように認識されているのか、またどの程度神経突起伸長に寄与しているのか (図1) は全く解明されていない。本研究では、Rab35 に特異的に結合する centaurin-β2 (Centβ2: ACAP2 と呼ばれる Arf6 の不活性化因子) に着目し、突起伸長におけるこれらの複合体の重要性を検討した。

Centβ2 はこれまでに報告された Rab35 結合分子の中で、唯一 Rab35 のみを認識するエフェクター分子である。そこでまず、Centβ2 と他の候補分子の Rab 結合特異性の相違点に着目し、Centβ2 との特異的結合に関与する Rab35 のアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、Rab35 にのみ保存された二つのスレオニン残基 (Thr-76 及び Thr-81) を見出し、これらのアミノ酸に変異を加えた Rab35 の点変異体 (T76S/T81A 変異体) は Centβ2 との結合能のみを欠損していることが明らかとなった。さらに、神経突起伸長のモデル細胞である PC12 細胞を用いて、Rab35 と Centβ2 の特異的結合の神経突起伸長に

における必要性をノックダウン—レスキュー実験により評価した。その結果、Rab35 欠損細胞で見られる神経突起伸長の阻害は、野生型の Rab35 の導入でレスキューされたが、Rab35(T76S/T81A)変異体の導入では回復できなかった。すなわち、Rab35 と Centβ2 の特異的結合は神経突起伸長において必須であることが明らかとなった。

【管状エンドソーム形成機構の解明】

管状エンドソームは、近年発見された RE の一種である。管状エンドソームが輸送する積荷や制御機構は、これまで報告されてきた一般的な RE とは異なることが報告されているが、その分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで、管状エンドソーム形成に必須の Rab の同定とその分子機構の解明に取り組んだ。

まず、「網羅的な局在スクリーニング」と「ノックアウト (KO) 細胞株の表現型解析」を組み合わせることで、「管状エンドソームに局在し、かつ、管状エンドソームの形成に必須の Rab」を探索した。解析の結果、管状エンドソームの必須制御因子として Rab10 を同定することに成功した。次に、管状エンドソームの形成機構を解明するために、*in silico* スクリーニングを実施し、新規 Rab10 エフェクター分子の同定を試みた。その結果、微小管上を駆動するキネシンの一種である KIF13A/B を同定した。さらに、KIF13A/B-double KO (DKO) 細胞株を樹立し、管状エンドソーム形成における KIF13A/B の必要性を検討したところ、KIF13A/B-DKO 細胞でも、Rab10-KO 細胞と同様に、管状エンドソームの消失が確認できた。また、KIF13A/B の Rab10 結合ドメインの欠損変異体やモータードメインの欠失変異体を用いた KIF13A/B-DKO 細胞のレスキュー実験により、KIF13A/B は Rab10 との結合とモーター活性を介して管状エンドソームを制御することが示唆された (図 2)。

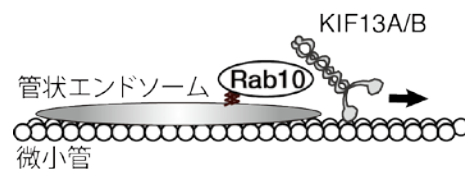


図2 管状エンドソーム形成の制御因子 Rab10 とその分子機構

【主要発表論文】

1. **Etoh, K.** & Fukuda, M. (2015) *J. Biol. Chem.* 290:9064-9074
2. **Etoh, K.** & Fukuda, M. (2018) *J. Cell. Sci.* in revision

論文審査結果の要旨

リサイクリングエンドソームはエンドソームに属するオルガネラの一つで、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた分子を適切な目的地まで輸送するための選別の場として機能している。近年、このリサイクリングエンドソームが神経突起伸長や繊毛形成などの生理現象に関与することが明らかになってきたが、リサイクリングエンドソームの形成・機能を制御する分子機構については未だ不明な点が多い。

本論文ではまず、リサイクリングエンドソームの制御因子である Rab35 とその特異的なエフェクター分子である centaurin- β 2 (Cent β 2) の神経突起伸長における重要性を検討した。部位特異的アミノ酸置換法により Rab35 と Cent β 2 の結合に必須のアミノ酸残基を同定し、Cent β 2 との結合が特異的に損なわれた Rab35 点変異体 (T76S/T81A 変異体) の作製に成功した。この変異体を用いて、Rab35–Cent β 2 複合体の神経突起伸長における必要性をノックダウン-レスキュー実験により評価した結果、Rab35 欠損細胞で見られる神経突起伸長の阻害は、野生型の Rab35 の導入でレスキューされたが、Rab35(T76S/T81A)変異体の導入では回復できなかった。すなわち、Rab35 と Cent β 2 の特異的結合は神経突起伸長において必須であることが示された。

次に、リサイクリングエンドソームの一つである管状エンドソームの形成機構に着目し、管状エンドソーム形成に必須の Rab の同定とその分子機構の解明に取り組んだ。網羅的な Rab の局在スクリーニングとノックアウト細胞株の表現型解析により、管状エンドソームの必須制御因子として新たに Rab10 を同定することに成功した。さらなる解析の結果、Rab10 は微小管上を駆動するキネシンの一種である KIF13A/B と結合すること、KIF13A/B のノックアウト細胞株でも管状エンドソームの消失が起こることが明らかになった。これらの結果から、KIF13A/B は Rab10 との結合とモーター活性を介して管状エンドソームの形成を制御することが示唆された。

以上のように、衛藤氏は当該研究分野において卓越した研究成果を挙げており、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有するものと判断できる。したがって、衛藤貫氏の提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。